

(21) Aktenzeichen: Anmeldetag:

P 40 11 991 2 12. 4.90 18. 10. 90 Offenlegungstag

DEUTSCHES

PATENTAMT

(3) Unionspriorität: (3) (3) (3) 12 04 89 JP 1-90844

(7) Anmelder:

Hitachi, Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:

Pagenberg, J., Dr.jur.; Frohwitter, B., Dipl.-Ing., Rechtsanwälte; Geißler, B., Dipl.-Phys.Dr.jur., Pat.u Rechtsanw.; Kowal-Wolk, T., Dr.jur., Rechtsanw.; Bardehle, H., Dipl.-Ing.; Dost, W., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Altenburg, U., Dipl.-Phys., Pat.-Anwäite, 8000 München

(7) Erfinder

Kambara, Hideki, Hachioji, Tokio/Tokyo. JP

(%) Verlahren zur DNA-Basensequenzbestimmung

Ein Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung kann wirkungsvoll DNA-basensequenzen von vielen Proben bestimmen, jeweils dadurch, daß die Proben simultan im Ge misch vererbeitet werden können, einschließend einen Schritt in dem eine Vielzehl von DNA-Proben mit jeweils unterschiedlichen Vektoren kloniert wird; einen Schritt, in dem die erhaltenen Proben im Gemisch mit Primern komplementar-ketten-synthetisiert werden, entsprechend den jeweiligen Vektoren, wobei die Primer nur mit einem besonderen der Vektoren einzeln hybridisiert werden können, und wobei die Primer mit jeweils unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind; einen Schritt in dem jede der erhaltenen behandelten Mischungen in vier Teile geteilt wird und wobei die DNA-Fragmentgruppen so gebildet werden, daß Endgruppen davon Adenin, Cytosin, Guanin bzw. Thymin werden können und einen Schritt, in dem die vier DNA-Fragmentgruppen, klassifiziert durch Endgruppen, auf Elektrophoresebahnen individuell unterschiedlich elektrophoretisch bewegt werden, und Fluoreszenzlicht, emittiert von den DNA-Fragmenten jeder DNA-Fragmentgruppe nachgewiesen wird

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur wirkungsvol-

len Basensequenzbestimmung Eine herkommliche Technik, die für die Bestimmung von DNA-Basensequenzen verwendet wird, ist Autoradiographie. Andererseits ist kurzlich ein Echtzeitnachweissystem unter Verwendung von Fluoreszenzmarkern entwickelt worden Bei dieser Technik werden DNA-Fragmente mit vier unterschiedlichen Fluoropho- 10 ren entsprechend den vier jeweiligen Sorten oder Arten von Anschlußgattungen, bzw. Endgruppen, bzw. endstandigen Basen markiers und auf eine Wanderungsbahr, bzw. Migrationsbahn zur Wanderung über eine bestimmte Entfernung injiziert und dann wird ein Laser- 15 strahl darauf angelegt, um zu beobachtendes Fluores zenzlicht zu emittieren. Die Endgruppen der DNA-Fragmente können durch die Wellenlängen des Fluoreszenzlichts erkannt werden und anhand der Nachweis-

zent kann die DNA-Basensequenz bestimmt werden. Bei einer anderen Technik werden DNA-Fragmente, die vier Sorten von Endgruppen haben und mit einem einzigen Fluorophor markiert werden, auf vier unterschiedliche Wanderungsbahnen injiziers, um das emittierte Fluoreszenzlicht zu messen und die DNA-Basen 25

sequenzen zu bestimmen Die obenerwähnten herkommlichen Techniken haben den Mangel, daß für jede zu bestimmende Probe komplizierte Vorbereitungen gemacht werden müssen. Um diese komplizierten Vorbereitungen zu vermei- 30 den, wird ein Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung angegeben, das einschließt

(1) einen Schritt 1, in dem verschiedene DNA-Proben in jeweils verschiedene Vektoren eingefügt 35 bzw.inkorporiert bzw.eingebaut werden; (2) einen Schritt 2, in dem in einem einzigen Rea-

genzrohrchen gleichzeitig komplementäre Ketten zu den DNA-Proben synthetisiert werden, um DNA-Fragmente zu bilden;

(3) einen Schritt 3, in dem die DNA-Fragmente elektrophoretisch getrennt und auf Filter immobili-

(4) einen Schritt 4, in dem eine mit einem Radioisotop markierte DNA-Sonde an einer der DNA-Pro- 45 ben angebracht wird, mit der sie als einziger hybridisieren kann, um das DNA-Fragment für die Bestimmung der DNA-Basensequenz in der DNA-

(5) einen Schritt 5, in dem die mit den Radioisotop 50 markierte DNA Sonde ausgewaschen wird und eine andere mit einem Radioisotop markierte Sonde an einer anderen DNA-Probe angebracht wird, mit der sie hybridisieren kann, um das DNA-Fragment DNA-Probe nachzuweisen und.

(6) einen Schritt 6, in dem das Verfahren nach Schritt 5 für die anderen restlichen DNA-Proben wiederholt wird, bis ihre Basensequenz bestimmt werden kann.

Das obenerwahnte Verfahren gestattet die gleichzeitige Reaktion bzw. Umsetzung und Elektrophorese zur Bestimmung der DNA-Basensequenzen von vielen Proben. Diese Technik wurde von G. M. Church et al. "Mul- 65 tiplex DNA Sequencing, Science, Bd. 240 (1988), Seiten 185 bis 188 beschrieben

Das obenerwähnte Verfahren kann nicht für Proben

verwendet werden, die anders als die Radioisotopen markiert sind, weil das DNA-Bandmuster auf dem Filter fixiert werden muß. Der Grund ist, daß die Verwendung von Floureszenzsonden die Lichtstreuung durch Filter zur Folge hat, was eine zu niedrige Empfindlichkeit er-

Es ist das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren anzugeben, welches die Schwierigkeiten der obenerwähnten herkömmlichen Technik vermeidet und eine DNA-Basensequenzbestimmung durch Fluoreszenzlichtnachweis mit einer Vielzahl von gleichzeitig zu verarbeitenden Proben moglich macht.

Als Ergebnis der Untersuchungen der Erfinder ist nun gefunden worden, daß das obenerwahnte Ziel der Erfindung mit einem Verfahren erreicht werden kann, das beinhaltet: einen Schritt 1, in dem verschiedene DNA-Proben in jeweils verschiedene Vektoren geklont werden, einen Schritt 2, in dem verschiedene Primer hergestellt werden, die einzig mit den entsprechenden Vektoren hybridisiert werden können und welche mit jeweils unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind, einen Schritt 3, in dem zu den in Schritt 1 erhaltenen Proben, im Gemisch mit den obenerwähnten verschiedenen Primern, komplementäre Ketten synthetisiert werden, elnen Schritt 4, in dem aus den bekannten Gemischen, die in Schritt 3 erhalten wurden, vier DNA-Fragmentgruppen mit jeweils vier unterschiedlichen Endgruppen hergestellt wrden; und einen Schritt 5, in dem die durch die Endgruppen klassifizierten vier DNA-Fragmentgruppen auf individuell unterschiedlichen Elektrophoresebahnen elektrophoretisch wandern gelassen werden und, daß von den DNA-Fragmenten jeder DNA-Fragmentgruppe emittierte Fluoreszenzlicht nachgewiesen

Auf der Grundlage der neuen Erkenntnis haben die Erfinder die vorliegende Erfindung weiter studiert und vervollständigt. Ein erfindungsgemäßen Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung ist wie folgt.

Es werden Einzelstrang-DNA-Proben hergestellt, bei 40 denen eine Vielzahl von Basensequenzen, jeweils eingefügt in verschiedene Vektoren, bestimmt werden sollen. Primer, deren Anzahl mit der Anzahl der Arten von Vektoren korrespondiert, deren Basensequenzen voneinander unterschiedlich sind und welche nur mit einem bestimmten Vektor hybridisiert werden können, werden mit jeweiligen Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen markiert. Die mit den jeweiligen Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen markierten Primer werden mit der Vielzahl der entsprechenden unterschiedlichen Vektoren für die jeweiligen Einzelstrang-DNA-Proben derart hybridisiert, daß alle DNA-Proben mit allen Primern gemischt und umgesetzt werden; das Gemisch der umgesetzten Proben wird in vier Teile aufgeteilt; in den in vier Teilen um ale nyuriumsereit Antin, um das DPA-riegniem zur Bestimmung der DNA-Basensequenz der 35 gefeilten Gemaschen der Froben werden einzeln kom plementare Ketten synthetisiert, so daß die Endgruppen davon Adenin, Cytosin, Guanin bzw. Thymin sind, wodurch einzeln eine DNA-Fragmentgruppe hergestellt wird, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Adenin 60 ist, eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Cytosin ist, eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Guanin ist, und eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Thymin ist; und die jeweiligen DNA-Fragmentgruppen werden eletrophoretisch wandern gelassen; individuelles Fluoreszenzlicht, das von den DNA-Fragmenten jeder Gruppe emittiert wird, wird nachgewiesen, und die Proben wer-

den getrennt und entsprechend den unterschiedlichen Emissionswellenlängen der Vielzahl der DNA-Proben

Als Vektoren können verwendet werden, z. B., ein benachgewiesen kannter M13-Vektor, YAC-Vektor, pUC-Vektor etc. Die Einzelstrang-DNA-Proben können in einer Art und Weise hergestellt werden, z. B., daß die gewünschte bzw. Ziel-DNA mit einem bestimmten Teil des Vektors kloniert wird und dann alkali-denaturiert wird, wie bekannt, Jeder Vektor hat eine Vielzahl von Klonierteilen. 10 jeder der Primer kann auf dem Weg erhalten werden, daß das Oglionucietid mit 18 bis 20 Basen, welches zu einem Teil des Vektors komplementar ist, künstlich synthetistert und fluoreszenzmarkiert wird. Da die erhaltenen Primer in ihrer Sequenzkonfiguration unterschied- 15 lich voneinander sind, konnen sie nur mit einem besonderen der einzelnen Vektoren hybridisiert werden. Die Fluorophoren, die die Primer markieren, können FITC (Fluorescein-isothiocyanat) mit 515 nm maximaler Emissionswellenlange, NBD-F (4-Fluor-7-nitrobenben- 20 zofurazan) mit 540 nm maximaler Emissionswellenlange, TRITC (Tetramethylrhodamin-isothiocyanat) mit 575 nm maximaler Emissionswellenlänge, Texas-Rot

mit 605 nm maximaler Emissionswellenlange usw. sein. Das Verfahren zur Hybridisierung der Primer mit den 25 Vektoren und die Bildung der DNA-Fragmente durch Synthese komplementarer Ketten kann mit üblichen

Methoden durchgeführt werden. Die Basensequenzen einer Vielzahl von Einzelstrang-DNA-Proben mit jeweils unterschiedlichen DNA-Ba- 30 sensequenzen können z.B. dadurch gleichzeitig bestimmt werden, daß die DNA-Fragmentgruppen, die gemaß der Sorte der Endgruppen klassifiziert sind, auf ihren jeweiligen Wanderungsbahnen wandern gelassen werden und, daß danach das Fluoreszenzlicht, das emit- 35 nert wird, durch das Anlegen eines Laserstrahls auf die Abschnitte mit einem bestimmten Abstand, zu denen die DNA-Fragmente wandern, durch bekannte Wellenlangentrennungsvorrichtungen, so wie Rotationsfilter oder ein Prisma aufgetrennt werden und jede der getrennten 40 Wellenlängen einzeln mit einem zweidimensionalen Fluoreszenzlichtdetektor nachgewiesen wird, wodurch die Proben getrennt und nachgewiesen werden, und auf der anderen Seite die Sorte der Endgruppen jedes DNA-Fragments bekannt wird, weil bekannt ist, auf 45 welcher Wanderungsbahn die Fluoreszenz emittiert

Die Wanderungsbahnen können auf einem Polyacrylamidgel oder Agarosegel zwischen Geltragerplatten, wie z B Quarz- oder Glasplatten, ausgebildet werden.

In Kurze kann das erfindungsgemaße Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung wie folgt zusammengefaßi werden. Unterschiedliche Primer werden mit Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen markiert. Zu Proben von unterschiedlichen 55 DNA-Fragmenten, die mit den Primern hybridisiert sind, werden im gemischten Zustand für jede Endgruppe komplementare Ketten synthetisiert. Die komplementar-ketten-synthetisierten Gemische werden auf unterschiedlichen Wanderungsbahnen entsprechend den je- 60 weiligen Sorten der Endgruppen wandern gelassen Fluoreszenzlicht, welches von Abschnitten emittiert wird, zu denen sie gewandert sind und auf die ein Laserstrahl angelegt ist, wird nachgewiesen und die vorbeiwandernden DNA-Fragmente werden nachgewiesen 65 Die Arten der Probe und der Endgruppen werden bestimmt durch die Emissionswellenlange bzw. die Lage der Wanderungsbahnen, wodurch die DNA-Basense-

quenz jeder Probe bestimmt wird. Weitere Vorteile. Merkmale und Anwendungsmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung in Verbindung mit der

Fig. 1 ist ein Probenherstellungsschmitdiagramm ei-Zeichnung. ner erfindungsgemäßen Ausführungsform

Fig. 2 ist eine Veranschaulichung und zeigt Gruppen der in den Schritten von Fig. 1 hergestellten Proben

Fig. 3 ist eine schematische Ansicht, die eine Elektrophorese-Vorrichtung vom Mehrfarben-Fluoreszenz Nachweistyp veranschaulicht, die in einer erfindungsgemaßen Ausführungsform verwendet wird, und

Fig. 4 ist eine vergroßerte Ansicht von Linienabbil dungen, die auf einem Bildschirm der Elektrophorese-

vorrichtung vom Mehrfarben-Fluoreszenz-Nachweistyp abgebildet wrden, die in einer erfindungsgemaßen Ausführungsform verwendet wird

Bezugnehmend auf die Fig. 1 bis 4 wird unten eine erfindungsgemäße Ausführungsform beschrieben Zuerst werden in der Ausführungsform zwei doppelstrangige DNAs (DNAa und DNAb) isoliert, deren Basensequenzen bestimmt werden sollen. In der vorliegenden Ausführungsform wird eine vordere und eine hintere Basensequenz der beiden doppelsträngigen DNAs in der rechten und umgekehrten Richtung bestimmt, d. h. insgesamt werden vier Basensequenzen bestimmt

Zu diesem Zweck werden vier unterschiedliche Vektoren 1 bis 4 verwendet, um die jeweiligen DNA-Basensequenzen zu bestimmen. Insbesondere werden die vordere Einzelstrang-DNAai und die hintere Einzelstrang-DNAa2 der doppelsträngigen DNAa und die vordere Einzelstrang-DNAbi und die hintere Einzelstrang-DNAb; der doppelsträngigen DNAb in jeweils unterschiediche Vektoren 1 bis 4 kombiniert, um neu angeordnete Vektoren zu bilden. Diese sind vier Einzelstrang-DNA-Proben 5 bis 8.

Andererseits werden die Primer 9 bis 12 hergestellt. die unterschiedliche DNA-Basensequenzen haben, wobei jeder nur mit einer Sorte der Vektoren 1 bis 4 hybridisjeren kann. Die Primer sind jeweils mit Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlangen markiert einschließlich eines Fluorescein-isothiocyanats mit 515 nm Emissionswellenlange (FITC, 4-Fluor-7-nitro benzolurazan mit 540 nm Emissionswellenlange (NBD-F), Tetramethylrhodamin-isothiocyanat mit 573 nm Emissionswellenlänge (TRITC) und Texas-Rot mit

605 nm Emissionswellenlänge. Sodann wird jede der DNA-Proben 5 bis 8 mit den jeweiligen Primern 9 bis 12 zum Hydrisieren zusammengemischt, Jeder Primer 9 bis 12 kann nur mit einem entsprechenden der Vektoren 1 bis 4 hybridisiert werden. Die erhaltenen hybridisierten DNA-Proben, wie in Fig. 1 gezeigt, sind die DNA-Proben 5-9, 6-10, 7-11 und 8-12 als ein verarbeitetes

Dann wird das verarbeitete Gemisch in jeweils vier Gemisch. Teile geteilt, Jeder Teil wird einzeln mit Deoxynucleotid und Dideoxynucleotid zusammengesetzt, so daß die jeweilige Endgruppe der vier Teile Adenin, Cytosin, Gua-

nin bzw. Thymin werden kann. Die Ergebnisse werden jeweiligen enzymatischen Umsetzungen unterworfen (in Fig. 1 gezeigt als A., C., G. bzw. T. Umsetzung) um die Komplementar-Ketten-Synthese zu vollziehen Die Komplementar-Ketten-Synthesen konnen indivi-

duelle DNA-Fragmentgruppen herstellen, deren Endgruppe des DNA-Fragments eine von den vier Sorten ist. Die DNA-Fragmentgruppen beinhalten die Gruppen A, C, G und T. Die Gruppe A (oder A-Familie) ist sensequenzen simultan zu bestimmen

die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Adenin ist Insbesondere ist die DNA-Fragmentgruppe A eine Gruppe, in der die Endgruppen der DNA-Probe, die mit den Vektoren hybridisiert wurde, Adenin sind. Sie beinhalter 5-9-A, 6-10-A, 7-11-A und 8-12-A, gezeigt in 5 Fig. 1. Die Gruppe C (oder C-Familie) ist die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Cytosin ist. Insbesondere ist das DNA-Fragment der Gruppe C eine Gruppe, in der die Endgruppen der DNA-Proben, die mit den Vektoren hybridisiert sind, Cytosin sind. Sie beinhaltet 5.9-C, 6-10-C, 7-11-C und 8-12-C, gezeigt in Fig. 2. Die Gruppe G (oder G. Familie) ist die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Guanin ist. Insbesondere ist die DNA-Fragmentgruppe G eine Gruppe, in der die Endgruppen, der mit den Vektoren hybridisierten DNA- 15 Proben, Guanin sind. Sie beinhaltet 5-9-G, 6-10-G. 7-11-G und 8-12-G, gezeigt in Fig. 2. Die Gruppe T (oder T-Familie) ist die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Thymin ist. Insbesondere ist die DNA-Fragmentgruppe T eine Gruppe, in der die Endgruppen der 20 mit den Vektoren hybridisterten DNA-Proben, Thymin ist. Sie beinhaltet 5-9-T, 6-10-T, 7-11-T und 8-12-T, gezeigt in Fig. 2.

In Fig. 3, in der die Elektrophoresevorrichtung vom Mehrfarben-Fluoreszenznachweistyp veranschaulicht 25 ist, enthält eine Elektrophoresetrenngelplatte 110 Polyacrylamid einer Konzentration von 6%, gebildet in einem 0.3 mm Raum zwischen Quarzplatten von 200 mm × 300 mm (nicht gezeigt). Es sollte angemerkt werden, daß die Konzentration des Polyacrylamids hier- 30 in angezeigt wird als dessen totale Monomerkonzentration in %-Gewicht pro Volumen (g/ml). Die Elektrophoresetrennplatte 110 hat Probeninjektionstaschen 112, 113, 114 und 115. Die Probeninjektionstaschen tragen die DNA-Fragmentgruppen A, C, G und T jeweils dort 35 hineingetropft durch eine Injektionsschablone bzw. Spritze, um diese wandern zu lassen. Die Elektrophoresetrenngelplatte 110 hat einen durch eine Seitenfläche derselben auf einen Abschnitt etwa 25 cm unterhalb des Bodens der Taschen gerichteten Laserstrahl 123, zu dem 40 die DNA-Fragmentgruppen wandern, und zwar unter Verwendung einer Laserstrahlquelle 116. Dies bewirkt, daß die DNA-Fragmentgruppen Fluoreszenzlicht emittieren. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch ein Prisma (nicht gezeigt) geteilt und Spektren verschiede- 45 ner Wellenlangen, die unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der Proben 5 bis 8 entsprechen, werden durch optische Bandpaßfilter erhalten. Diese Fluoreszenzspektren werden auf einen Fokussierungsteil eines zweidimensionalen Fluoreszenzlichtdetektors 117 fo 50 kussiert, um Fluoreszenzlichtabbildungen entsprechend den Proben 5 bis 8 zur Verfügung zu stellen

Die Fluoreszenzlichtabbildungen, die auf den Fokussierungsteil des zweidimensionalen Fluoreszenzlichtde tektors 117 fokussiert sind, können durch einen Bild- 55 schirm 121 als vier Linienbilder 122 entsprechend den jeweiligen Proben 5 bis 8 wiedergegeben werden. Zur gleichen Zeit können die Fluoreszenzlichtbilder durch eine Anzeige 120, durch eine Steuerung 118 und eine Datenverarbeitungseinheit 119 wiedergegeben werden. 60

Fig. 4 zeigt eine vergrößerte Abbildung der Linienbilder 122, die auf dem Bildschirm 121 abgebildet werden. Die vier Linienbilder entsprechen den jeweiligen Proben 5 bis 8 abwarts Die Flachen A, C, G und T, angezeigt durch Punktlinien sind Flächen, die den jeweiligen 65 DNA-Fragmentgruppen A. C. G und T jeder der Probe entsprechen. Die auf diese Weise erhaltenen Daten können arithmetisch verarbeitet werden, um die DNA-Ba-

In dieser Ausbildungsform werden als Laserstrahlenquellen ein Argoniaser mit 488 nm Wellenlänge und ein He-Ne-Laser mit 543 nm Wellenlange verwendet. Der Argonlaser und der He-Ne-Laser können in einer Einheit integriert werde, um den gleichen Abschnitt oder unterschiedliche Abschnitte zu bestrahlen, die 2 mm oder mehr beabstandet sind. Für die Anregung von FITC und NBD-F der markierenden Fluorophore wird der Argonlaser verwendet; für die Anregung von TRITC und Texas-Rot wird der He-Ne-Laser verwendet Für große Probenanzahlen können zusätzliche Fluorophore mit langeren Wellenlangen verwendet werden. Für die zusätzlichen Fluorophore kann ein weiterer He-Ne-Laser mit 633 nm Wellenlange oder ein

Halbleiterlaser verwendet werden. Die oben beschriebene Ausführungsform laßt deutlich erkennen, daß das erfindungsgemäße Verfahren insofern vorteilhaft ist, daß so viele Proben bearbeitet werden können, wie Mischungsformen selbst, wobei gleichzeitig der betriebsmäßige Aufwand reduziert werden kann. In dem Verfahren, in dem die DNA-Fragmentgruppen A, C, G und T mit verschiedenen Farben markiert sind und auf der gleichen Bahn wandern, mussen die Wanderungszeitdifferenzen, bedingt durch die Farbdifferenzen korrigiert werden. Das erfindungsge maße Verfahren ist auch in dieser Hinsich vorteilhaft, weil es keine Korrektur der Wanderungsgeschwindigkeitsdifferenzen benötigt, die durch den Unterschied der Markierungsfarbstoffe bedingt sind, da die gleiche Probe mit der gleichen Farbe markiert werden kann

Patentansprüche

1. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung.

umfassend die Schritte: i) Klonieren einer Vielzahl von DNA-Proben mit jeweils unterschiedlichen Vektoren (1, 2, 3,

ii) Komplementar-Ketten-Synthetisieren der Proben (5, 6, 7, 8) erhalten in Schritt i) im Gemisch mit Primern (9, 10, 11, 12), entsprechend den jeweiligen Vektoren (1, 2, 3, 4), wobei die Anzahl der Primer (9, 10, 11, 12) der Anzahl der Sorten von Vektoren (1, 2, 3, 4) entspricht, jeder dieser Primer (9, 10, 11, 12) in der Lage ist. ausschließlich mit einem spezifischen dieser Vektoren (1, 2, 3, 4) zu hybridisieren, und die Primer (9, 10, 11, 12) mit Fluorophoren markiert sind, die jeweils unterschiedliche Welleniii) Herstellen von vier DNA-Fragmentgrup-

pen mit jeweils vier unterschiedlichen Endgruppen aus dem behandelten Gemisch (5-9, 6-10, 7-11, 8-12) erhalten in Schritt ii); und iv) elektrophoretisches Wandernlassen der vier DNA-Fragmentgruppen und Nachweis des Fluoreszenzlichts, emittiert von den jeweiligen DNA-Fragmenten in jeder DNA-Frag-

2. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung. umfassend die Schritte

i) Klonieren einer Vielzahl von unterschiedlichen Einzelstrang-DNA-Proben, deren Basensequenz bestimmt werden soll, mit jeweiligen Vektoren (1, 2, 3, 4), unterschiedlich für jede

ii) Markieren der Primer, deren Anzahl der

Anzahl der Sorten von Vektoren (1, 2, 3, 4) entspricht, deren Basensequenzen unterschiedlich voneinander sind und die nur minem spezifischen Vektor hybridistert werden konnen, und zwar mit jeweiligen Fluoropho- en mit unterschiedlichen Emissionswellenlan-

iv) Teilen jeder der Mischungen (5-9, 6-10, 7-11, 8-12) der Proben, verarbeitet in Schritt 3, in vier Teile:

in viet Teile;

9. Komplementar-Ketten Symthetisieren der

9. Komplementar-Ketten Symthetisieren der

viergeteiten Gemäche (3-6) (3-71.8-12)

der Proben inte Goden House House House von der Stellen Gemäche House House von der Stellen Gemäche House House von der Stellen Gemäche House House konnen wobei individuell eine DNA 23

Fragmentgruppe hergestellt wich die Endgruppe des DNA-Fragments Goden ist, eine

DNA-Fragmentsgruppe. Option ist, eine

DNA-Fragments Guain ist, und eine

DNA-Fragments Tymin ist, und eine

DNA-Fragments Tym

o) elektrophoretisches Wandernlassen der DNA-Fragmentgruppen, Nachweisen des indi- 39 viduellen Fluoreszenzlichts, emittern on den DNA-Fragmentgruppen, und Tremon und Nachweisen der Proben nach ihren unterschiedlichen Emissionswellenlängen, und zwar on einer Vetzahl von DNA-Proben.

3 Verfahren zur DNA-Basensequenbestimmung nach Ansprüch; in der Frennung und der Nachweise der Der Frennung und der Nachweise der Der Frennung und der Nachweise der Der Frennung und der Reinstellung der State der Sta

nach Anspruch 3, in dem die Proben erstert und nachgewiesen werden durch Flooreszenfaltweileniang werden ge-Flooreszenfaltweileniang ersternischen der jeweiligen DNA-Fragen erste Laserstrahb (123) auf wird durch dat zu bestimmten Abstanden. zu denen die DNA-Fragenentgruppen auf den Wanderungsbahnen wander

5 Verlahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 4, in dem die Trennung und der es Nachweis der Proben unter Verwendung der Fluoreszenzlichtemissionswellenlangenunterschiede der DNA-Fragmentgruppen in der Art durchge-

führt wird, daß das Fluoreszenzlicht der DNA-Fragmenigruppen mit einer Wellenlängentrennvorrichtung aufgetrennt wird und jede der getrennten Wellenlängen individuell durch einen Detektor (117) nachgewiesen wird.

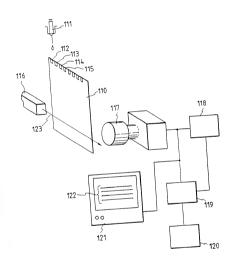
6. Verlahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 5, in dem der Detektor (117) ein zweidmensionaler Fluoreszenzlichtdetektor ist

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

FIG. 2

A-Famulie	5-9-A	6-10-A	7-11-A	8- 12- A
C-Familie	5-9-0	6 - 10 - C	7-11-0	8 - 12 - C
G-Familie	5-9-6	6 - 10 - G	7 - 11 - 6	8 - 12 - G
T-Familie	5-9-T	6-10-T	7 – 11 – T	8 - 12 - T

FIG. 3



int. Cl.⁵: Offenlegungstag: G 01 N 33/68 18. Oktober 1990

FIG. 4

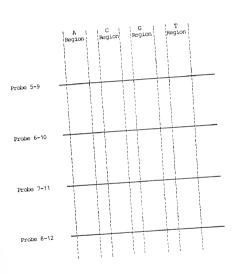


FIG. 1

